

NOVEL MICROORGANISM BELONGING TO BIFIDOBACTERIUM LONGUM, PREPARATION OF ITS MICROBIAL CELL, AND COMPOSITION CONTAINING SAID MICROORGANISM

Patent Number: JP58224685
Publication date: 1983-12-27
Inventor(s): KAWASHIMA TAKUJI; others: 04
Applicant(s): MORINAGA NIYUUGIYOU KK
Requested Patent: JP58224685
Application Number: JP19820106182 19820622
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N1/20; A23K1/00; A23L1/00; A61K35/74
EC Classification:
Equivalents: JP1605020C; JP59053829B

Abstract

PURPOSE: To obtain novel microbial cell resistant to acid and useful as a food, feed and medicine for intestinal disorder, by the anaerobic cultivation of human feces.
CONSTITUTION: Human feces, especially feces of a suckling baby are diluted with physiological saline water, and cultured anaerobically in MG agar plate medium at 37 deg.C. The colony having the characteristic shape of Bifidobacterium, the Gram-positive character, and rod, clavate or branched cell form is fished from the obtained colonies, and subjected to the anaerobic culture in an MG agar plate medium in the same manner as above to obtain a separated pure bacterial strain. The strain is cultured anaerobically in an MG agar plate medium adjusted to 4.5-5.5pH, and the obtained colony is subjected to the anaerobic culture in an MG agar plate medium containing 0.5-1.0 unit of penicillin G potassium per 1ml. The objective Bifidobacterium longum M-8201 (FERM- P No.6548) having strong acid resistance can be separated from the well-grown strains.

Data supplied from the **esp@cenet** database - 12

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—224685

⑬ Int. Cl.³
C 12 N 1/20
A 23 K 1/00
A 23 L 1/00
A 61 K 35/74
// A 23 C 9/12
(C 12 N 1/20
C 12 R 1/01)

識別記号

1 0 1

A C R

庁内整理番号

7115—4 B

7803—2 B

7258—4 B

7138—4 C

7236—4 B

⑭ 公開 昭和58年(1983)12月27日

発明の数 4

審査請求 未請求

(全 19 頁)

⑮ ビフィドバクテリウム・ロンガムに属する新規微生物、その菌体の製造法および該微生物を含む組成物

⑯ 特 願 昭57—106182

⑰ 出 願 昭57(1982) 6 月22日

⑱ 発 明 者 川島拓司
川崎市高津区土橋 3—18—5

⑲ 発 明 者 工藤力
横浜市緑区若草台 4—74

⑳ 発 明 者 平松明德
八王子市鹿島 8—4—301

㉑ 発 明 者 寺口進
多摩市落合 3—4—3—501

㉒ 発 明 者 八重島智子
東京都目黒区南 2—6—7

㉓ 出 願 人 森永乳業株式会社
東京都港区芝 5 丁目33番 1 号

㉔ 代 理 人 弁理士 津田昭

明 細 書

1. 発明の名称

ビフィドバクテリウム・ロンガムに属する新規微生物、その菌体の製造法および該微生物を含む組成物

2. 特許請求の範囲

(1) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pH を 4.3 に調整して 5℃ で 7 日間保持した時、少くとも 1 % の生存率を有する耐酸性を示すビフィドバクテリウム・ロンガム。

(2) 前記のビフィドバクテリウム・ロンガムが下記の菌学的性質を示すことを特徴とする特許請求の範囲第 1 項に記載の菌株。

(a) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pH を 4.3 に調整して 5℃ で 7 日間保持した時、少

くとも 1 % の生存率を有する耐酸性。

(b) B L 寒天平板培地を用い、37℃ で 48

時間嫌気培養したときの菌の形態：

① 大きさ：0.5～0.8×1.7～4.0 μ

② 形 状：桿状あるいは分枝状

(c) B L 寒天平板培地を用い、37℃ で 48

時間嫌気培養したときのコロニーの形態：

① 形状：円形

② 隆起：凸円状

③ 周縁：円滑

④ 大きさ(直径)：1～3 mm

⑤ 色調：褐色で不透明

⑥ 表面：円滑で光沢あり

(d) ガス：産生せず

(e) 15℃ で発芽せず

(f) 運動性なし

(g) 好氣的条件下で発育せず

(h) ブドウ糖からの主発酵生成物：乳酸および酢酸

(i) 糖からの酸生成：

アラビノース、キシロース、グルコース、フラクトース、ガラクトース、シュクロース、マルトース、ラクトース、メリビオースおよびメレチトースは陽性、

ラムノース、リボース、セロビオース、トレハロース、グリコーゲン、イヌリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、エスクリン、サリシン、アミグダリンおよびグルコン酸塩は陰性、

ラフィノースおよびデキストリンは遅れて陽性、マンノース、スターチおよび α -メチルグルコシ

フィドバクテリウム属特有の形態を示し、グラム陽性であって、棒状、こん棒状または分岐状の菌形を示すコロニーを釣菌すること、得られた菌を上記嫌気性菌培養用寒天平板培地で、37℃においてさらに嫌氣的に培養すること、および得られた菌をpH 4.5～5.5であって、上記嫌気性菌培養用寒天平板培地で培養し、さらに0.5～1.0単位/mlのペニシリンGカリウムを含む上記の嫌気性菌培養用寒天平板培地で培養し、生育の良い菌株中より下記の菌学的性質を有する菌株を分離採取することを特徴とする菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して、5℃で7日間保持した時、少くとも1%の生存率を有する耐酸性を示すフィドバクテリウム・ロンガムの製造方法。

Dは遅れて弱陽性、

(j) インドール：産生せず、

(k) 硫化水素：産生せず、

(l) 硝酸塩を還元せず、

(m) カタラーゼ：陰性、

(n) ペニシリンを含むMG寒天平板培地（ペニシリンGカリウム：0.5～1.0単位/ml）で発育する。

(3) 前記のフィドバクテリウム・ロンガムがフィドバクテリウム・ロンガムM-8201（微生物研究第6548号）であることを特徴とする特許請求の範囲第1項または第2項に記載の新菌株。

(4) 人の糞便を生理食塩水で希釈し、嫌気性菌培養用寒天平板培地で、37℃において嫌氣的に培養すること、得られたコロニーの中からビ

(5) 前記の菌学的性質が下記のものであることを特徴とする特許請求の範囲第4項に記載の方法。

(a) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して5℃で7日間保持した時、少くとも1%の生存率を有する耐酸性、

(b) B.L寒天平板培地を用い、37℃で48時間嫌気培養したときの菌の形態：

① 大きさ：0.5～0.8×1.7～4.0 μ

② 形状：棒状あるいは分岐状

(c) B.L寒天平板培地を用い、37℃で48時間嫌気培養したときのコロニーの形態：

① 形状：円形

② 隆起：凸円状

③ 周縁：円滑

- ④ 大きさ(直径): 1~3 mm
- ⑤ 色調: 褐色で不透明
- ⑥ 表面: 円滑で光沢あり
- (d) ガス: 産生せず
- (e) 15℃で発育せず
- (f) 運動性なし
- (g) 好氣的条件で発育せず
- (h) ブドウ糖からの主発酵生成物: 乳酸および酢酸
- (i) 糖からの酸生成:
- アラビノース、キシロース、グルコース、フラクトース、ガラクトース、シュクロース、マルトース、ラクトース、メリビオースおよびメレチトースは陽性、
- ラムノース、リボース、セロビオース、トレハロー

くとも1%の生残率を有する耐酸性を示すビフィドバクテリウム・ロンガムを生育培地に培養して、菌体を増殖させることを特徴とする前記ビフィドバクテリウム・ロンガムの製造方法。

- (7) 前記のビフィドバクテリウム・ロンガムがビフィドバクテリウム・ロンガムM-8201(微工研菌寄第6548号)であることを特徴とする特許請求の範囲第6項に記載の方法。

- (8) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して、5℃で7日間保持した時、少くとも1%の生残率を有する耐酸性を示すビフィドバクテリウム・ロンガムの生菌菌体を含有することを特徴とする組成物。

- (9) 前記のビフィドバクテリウム・ロンガムがビフィドバクテリウム・ロンガムM-8201

特開昭58-224685(3)

- ス、グリコーゲン、イヌリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、エスクリン、サリシン、アミグダリンおよびグルコン酸塩は陰性、
- ラフィノースおよびデキストリンは遅れて陽性、
- マンノース、スターチおよびα-メチルグルコシドは遅れて弱陽性、
- (j) インドール: 産生せず、
- (k) 硫化水素: 産生せず、
- (l) 硝酸塩を還元せず、
- (m) カタラーゼ: 陰性、
- (n) ペニシリンを含むMG寒天平板培地(ペニシリンGカリウム: 0.5~1.0単位/mL)で発育する。
- (6) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して、5℃で7日間保持した時、少

(微工研菌寄第6548号)

であることを特徴とする特許請求の範囲第8項に記載の組成物。

- (10) 前記の組成物が食品としての用途を有することを特徴とする特許請求の範囲第8項または第9項に記載の組成物。

- (11) 前記の組成物が飼料としての用途を有することを特徴とする特許請求の範囲第8項または第9項に記載の組成物。

- (12) 前記の組成物が整腸剤としての用途を有することを特徴とする特許請求の範囲第8項または第9項に記載の組成物。

3. 発明の詳細な説明

本発明は耐酸性を有するビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifido-bacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・ロンガムM-8201

(*Bifido-bacterium longum* M-8201)

(以下「本菌」と記載する)、その製造方法およびこれらを含む組成物に関する。

本発明の目的は耐酸性を有する点に有用性の高い新規微生物を提供すること、この新規微生物を分離採取することおよびこの新規微生物を増殖することからなる新規微生物の菌体の製造方法を提供することにある。

本発明のもう1つの目的は耐酸性を有する新規微生物を含有する食品用、飼料用ならびに整腸剤組成物を提供することにある。

本明細書における「生残率」は試験開始時の生菌数に対する保存後の生菌数の百分率であり、また「嫌気性菌培養用寒天平板培地」はB L寒天平板培地、MG寒天平板培地、その他嫌気性菌を培

berorum)、B. ラクテンチス(*B. lacten-^tis*)、B. アドレッセンチス*a* (*B. adol-^tescentis a*) ~ *d*、B. ロンガム*a* (*B. longum a*) と *b* の8菌種に分類し (*Zentralblatt für Bakteriologie, parasitenkunde, Infektions Krankheiten und Hygiene: Abt. 1, Originale*, 191巻第486頁、1963年)、光岡は人および動物に由来するすべての菌をB. ビフィダムについて2つのタイプ、B. インファンチスについて2つのタイプ、B. プレーベについて3つのタイプ、B. パルブローラムについて2つのタイプ、B. サーモフィルム (*B. thermophilum*) について4つのタイプ、B. アドレッセンチスについて4つのタイプ、B. ロン

養するために一般に広く使用されている寒天平板培地である。

ビフィドバクテリウム属に属する微生物は、人または動物(たとえば、豚、ニワトリ、モルモット、ネズミ、マウスなど)の消化管、糞便中に見出され、これらのものから多数の菌種あるいは菌株が分離されている。

ビフィドバクテリウム属に属する菌の分類については、1963年にRenterが人に由来する菌をビフィドバクテリウム(以下「B.」と略記する)・ビフィダム*a* (*Bifido-bacterium bifidum a*) と *b*、B. インファンチス (*B. infantis*)、B. パルブローラム*a* (*B. parvulorum a*) と *b*、B. プレーベ*a* (*B. breve a*) と *b*、B. リベローラム (*B. Li-*

gamについて4つのタイプ、B. シュードロンガム (*B. pseudo-longum*) について4つのタイプ、B. リベローラムおよびB. ラクテンチスについてそれぞれ1つのタイプに分類して報告している。

そして国際微生物学会の中におかれている細菌の命名と分類についての国際委員会のビフィドバクテリウム小委員会はB. ビフィダム、B. インファンチス、B. プレーベ、B. サーモフィルム、B. アドレッセンチス、B. ロンガム、B. シュードロンガム、B. スイス (*B. suis*)、B. コリネフォルメ (*B. coryneforme*)、B. アステロイデス (*B. asteroides*) およびB. インディカム (*B. indicum*) の11菌種に分類し、Bergey's Manual第8版にもとりあげ

られている (Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. ; *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., 第669頁〜第676頁, Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1974年)。

そしてビフィドバクテリウムに属するその他の菌種については、Scardovi (*Archiv für Mikrobiologie* 第68巻、第278頁 1963年および *Zentralblatt für Bakteriologie, parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* : Abt. II, Originale, 第123巻、第64頁 1969年) により、B. ルミナーレ (B. ruminale) および B. グロボスム (B. glo-

ksonii) がそれぞれ報告されている。更に American Type Culture Collection (以下「ATCC」と略記する) のカタログ (*Catalogue of Strains I*, 13th ed., 第45頁〜第47頁, 1978年) によれば、前記の種の他に B. ベルミフォルメ (B. vermiforme) が知られている。このように、ビフィドバクテリウム属に属する菌種は多数知られているが、ビフィドバクテリウム属の菌種の分類の日本における権威者であり、前記国際委員会の委員である光岡の著書 (木間道、光岡知足共編「*ビフィズス菌*」第35頁〜第36頁、朝倉社、1978年7月) によれば、現状では、なお主として糖分解性状によって次のように鑑別分類するのが妥当であるとされている。

bosum) が、Crociani (*International Journal of Systematic Bacteriology*, 第24巻、第6頁, 1974年) により、B. デンチウム (B. dentium)、B. カテヌラツム (B. catenulatum) および B. アングラツム (B. angulatum) が、Zani (*International Journal of Systematic Bacteriology*, 第24巻、第29頁 1974年) により、B. マグナム (B. magnum) が、Trovatelli (*Archiv für Mikrobiologie*, 第98巻、第187頁, 1974年) により、B. プローラム (B. proclorum) が、Georg (*Journal of Bacteriology*, 第88巻、第477頁, 1964年) により、B. エリクソニ (B. eri-

それによればこの属の種は、B. ビフィダム a、B. ビフィダム b、B. インファンチス サブスピーシーズ (以下「ss.」と略記する) インファンチス (B. infantis subspecies infantis)、B. インファンチス ss. リベローラム、B. インファンチス ss. ラクテンチス、B. プレーベ ss. プレーベ、B. プレーベ ss. パルプロラム、B. サーモフィルム (B. ルミナーレと同一表現型)、B. アルドレッセンチス a、B. アルドレッセンチス b (B. デンチウムおよび B. エリクソニと同一表現型)、B. アルドレッセンチス c (B. カテヌラツムと同一表現型)、B. アルドレッセンチス d (B. アングラツムと同一表現型)、B. ロンガム ss. ロンガム a、B. ロンガム ss. ロンガム b、B. ロンガム ss. アニ-

マリスa (B. animalis a) (B. マグナム、
B. スイスおよびB. プローラムと同一表現型)、
B. ロンガムss. アニマリスb、B. シュードロ
ンガム (B. グロボスムと同一表現型)、B. ア
ステロイデス (B. コリネフォルメと同一表現型)
およびB. インディカムである。さらに光岡の最
近の著書 (光岡知足著「腸内菌の世界」叢文社、
1980年8月) によればB. ロンガムss. アニ
マリスaおよびbは、B. ロンガムの亜種 (s-
ubspecies) ではなく、新たにB. アニマリス
として分類されている。

B. ロンガムに属する公知種の菌株の菌学的性
質について前記光岡およびBergey's Manual
第8版に記載されている事項をまとめれば、第1
表のとおりである。

種および バイオタイプ	B. ロンガム var. ロンガム	B. ロンガム var. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム
ガラクトース			+	+	+	+
シュクロース	+	+	+	+	+	+
マルトース	+	+	+	+	+	+
セロビオース	-	-	-	-	-	-
ラクトース	+	+	+	+	+	+
トレハロース	+	+	+	+	+	+
メリビオース	+	+	+	+	+	+
ラフィノース	+	+	+	+	+	+
メレチトース	+	+	+	+	+	+
デキストリン	+	+	+	+	+	+
スターチ	+	+	+	+	+	+

(後二行)

種および バイオタイプ	B. ロンガム var. ロンガム	B. ロンガム var. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム
グリコーゲン	-	-	-	-	-	-
イヌリン	-	-	-	-	-	-
マンニトール	-	-	-	-	-	-
ソルビトール	-	-	-	-	-	-
イノシトール	-	-	-	-	-	-
リビトール	-	-	-	-	-	-
ズルシトール	-	-	-	-	-	-
グリセロール	-	-	-	-	-	-
エリスリトール	-	-	-	-	-	-
ラムノース	-	-	-	-	-	-
エスクリン	-	-	-	-	-	-

(後二行)

第1表

文 献	(1)		(2)		(3)
	B. ロンガム var. ロンガム	B. ロンガム var. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム
種および バイオタイプ					
46.5℃に おける生育	-	+	+	+	+
リトマス ミルク凝固	+	+	+	+	+
アラビノース	+	+	+	+	+
キシロース	+	+	+	+	+
リボース	+	+	+	+	+
マンノース	+	+	+	+	+
フラクトース	+	+	+	+	+
グルコース	+	+	+	+	+

(後二行)

文 献

(1) 日本細菌学雑誌、第24巻 第6号 第261
頁〜第280頁、1969年。

(2) 本間道、光岡知足共編「ビフィズス菌」第
52頁 株式会社ヤクルト本社、1978年7月。

(3) Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E. 編、
Bergey's Manual of Determinative
Bacteriologyの第8版、第672頁〜第
673頁、Baltimore, The Williams &
Wilkins Co., 1974年。

記号の説明

- +: 強陽性
- : 陰 性
- S: おくれて反応
- ±: 陰性またはおくれて弱陽性
- ✓: 不 定
- : まれに陽性

菌および バイオタイプ	B. ロンガム var. ロンガム	B. ロンガム var. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム	B. ロンガム ss. ロンガム	注1)
サリシン	-	-	-	-	-	
アミグダリン	-	-	-	-	-	
α-メチル グルコシド	+	+	+	+	+	
α-メチル マンノシド						
グルコネート						
備 考						

注 1

(a) 細胞は長く、彎曲した棍棒状あるいは隆起又
は啞鈴状の桿状であり、二またに分かれることが
ある。

(b) グラム染色性は変動する。

(c) コロニは凸状ないしクッション状あるいは全
縁、直径2〜5mm、軟かく湿潤し、光沢または粘
性あり。

(d) グルコースからの最終生産物: 酢酸および
L-(+)-乳酸、ガス酸性せず。

(e) ペントースを発酵し、グルコン酸塩を発酵し
ないビフィドバクテリアは、通常この種に分類さ
れ、以前デーネルト (1957年および1960年)
の第5群に分類されていた。

(f) 46.5℃および20℃において生育せず。

(g) 乳児および成人の糞便から分離される。

(h) 標準菌株: E194b、ATCC15707

(Reuter、1971年)

特開昭58-224685 (8)

一方ビフィドバクテリウム属に属する菌は、人又は動物の腸内菌叢を形成する主要な菌であることが知られており、従来これらの菌は整腸剤、食品、栄養剤あるいは飼料に広く利用されている。

しかしながら、ビフィドバクテリウム属に属する公知の菌は一般に耐酸性に乏しく、酸性の状態におけるこの菌の生存率は極めて低い（日本細菌学雑誌、29巻4号、691～697頁、1974年及び薬剤学、28巻、4号、331～332頁、1968年）。そしてこの菌を用いて発酵乳を製造し、pH 4.6～4.9で7日間保持した場合、この菌の生存率は約 $\frac{1}{100}$ に減少することも知られている（F. Müllerら；*Milchwissenschaft*、23巻、9号、554～558頁及び10号、614～618頁、1968年）。そし

ている（特開昭52-83975^{号公報}）。又、先に川島らが発明した特許第708393号（特公昭47-29995号公報）におけるラクトバチルス・ビフィダス変異株M-7204（*Lactobacillus bifidus* var. M-7204）（微生物研寄第1324号。以下寄託株という。）は、耐酸性を有する菌株であり、そしてこの菌株は現在の分類によればB. ロンガムに属する変異株である。しかし後述するように寄託株と本菌とは菌学的性質が異なり、特に耐酸性において本菌が格段にすぐれている。

以上のように多量、多株にわたって人の消化管に存在するビフィドバクテリウム属の細菌のうち、年齢を問わず人の腸管内に広く存在することが知られ（*American Journal of Clinical*

て Müller らはこの論文の中でビフィドバクテリウム属を含む発酵乳製品において、製品のpHが4.3以下であってはならないと述べている。

このことはこの菌がpH 4.3以下において急激に死滅することを意味している。従って、公知のビフィドバクテリウム属に属する菌を食品、医薬品、飼料に使用する場合、酸性の食品の保存中に、又、食品、経口投与医薬品又は飼料とせして用いたときには、人あるいは動物の胃の低いpHにおいて死滅する欠点がある。

このような点からビフィドバクテリウム属に属する耐酸性菌について研究がなされ、B. ビフィダムについて耐酸性を有する変異株の存在することが知られ（特公昭56-42250^{号公報}）、そしてこれらの変異株を用いた発酵乳の製造法も知られ

l Nutrition、30巻、1799～1810頁、1977年）、その出現頻度が最も高い（*Cancer Research*、55巻、3407～3417頁、1975年）B. ^{ロンガム}~~longum~~ について耐酸性を有する菌株を取得することは食品、飼料あるいは医薬品産業上特に利用価値の高いものであるが、^未満足すべき菌株は知られていない。

本発明者らは、ビフィドバクテリウム・ロンガムに属する菌であって、強い耐酸性を有する菌を分離すべく検索を行ない、健康な乳児糞便からビフィドバクテリウム・ロンガムに属し、耐酸性を有する有用性ある菌株を見出した。

次に本発明について詳細に記載する。

(1) 耐酸性菌株の取得

本発明者らは前記のような耐酸性を有する菌株

を自然界から取得すべく、ビフィドバクテリウム属に属する菌種が多数存在する健康な乳児の糞便から次の方法により菌株の分離を行なった。

乳児糞便を滅菌生理食塩水で適宜希釈し、MG寒天培地 (Modified Garcke's Agar の略、寺口ら、食品衛生学雑誌、23巻、1号、39～44頁、1982年) の平板に塗抹し、37℃で嫌気培養した。そして得られたコロニーの中でビフィドバクテリウム属特有の形態を示し、かつ塗抹標本の顕微鏡観察によりグラム陽性であり、棒状、こん棒状又は分岐状の菌形を示す菌を釣菌しMG寒天平板培地に画線塗抹し、前記と同様の方法で嫌気培養を反復し、純粹に単離された菌株を得た。この菌株をpH 4.5～5.5に調整したMG寒天平板培地で嫌気培養し、得られたコロニーを

f) 糖からの酸生成

アラビノース、キシロース、グルコース、フラクトース、ガラクトース、ジュークロース、マルトース、ラクトース、メリビオース、メレチトースは陽性、

ラムノース、リボース、セロビオース、トレハロース、グリコーゲン、イヌリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、エスクリン、サリシン、アミグダリン、グルコン

酸塩は陰性、

ラフィノース及びデキストリンは遅れて陽性、マンノース、スターチ及びα-メチルグルコシドは遅れて弱陽性、

g) インドール産生せず

h) 硫化水素産生せず

特開昭58-224685 (9)

更にペニシリンGカリウム (明治製菓製) 0.5～

1.0単位/ml含有MG寒天平板培地で嫌気培養し

20余の菌株を得た。次いでこれらの菌株を上記

2種のMG寒天平板培地で嫌気培養を反復し、

最も生育のすぐれた1菌株を分離した。

(2) 菌学的性質

この分離した菌株の菌学的性質は、次のとおりである。

2-1) 生理学的性質

a) ガスを産生せず

b) 15℃で発育せず

c) 運動性なし

d) 好氣的条件下で発育せず

e) ブドウ糖からの主な発酵生成物

乳酸及び酢酸

i) 硝酸塩を還元せず

j) カタラーゼ陰性

k) ペニシリン含有MG寒天平板培地 (ペニシリンGカリウム0.5～1.0単位/ml) で発育 (後述する(3)の試験参照)。

l) 耐酸性 (後述する(4)の試験参照)

菌体を滅菌した緩衝液に懸濁してpHを4.3に調整し、5℃で7日間保持した時、少なくとも1%の生存率を示す。

2-2) 形態学的性質

a) 菌形 (光学顕微鏡による観察)

B₁寒天平板培地 (光岡知足; 臨床検査、

18巻、1163～1172頁、1974年)

を用い、37℃で48時間常法により嫌気培

養した本菌は、0.5～0.8×1.7～4.0μ、

特開昭58-224685 (10)

桿状、こん棒状又は分岐状の菌形を有する。

b) コロニーの形態

前記2-2)のa)と同一の条件で培養した本菌のコロニーの形態(光岡知足著「腸内菌の世界」、110頁、巖文社、1980年8月)は次のとおりである。

形 状: 円形 (circular)

隆 起: 凸円状 (convex)

周 縁: 円滑 (entire)

大きさ (直径): 1~3 mm

色 調: 褐色で不透明

表 面: 円滑で光沢あり

以上の菌学的性質から、本菌は糖の発酵性のうちATCCのカatalog記載の菌株(以下ATCC株と記載する)とはリボース及びラフィノースに

ついて異っているが、分類学上公知のB. ロンガ

ムに属する菌学的性質を示し、かつ耐酸性において公知のATCC株と異っている。さらにこの性質は20代にわたって継代培養しても維持されていたので、本菌独特の性質とみることができ、本菌は公知の菌株にはないすぐれた耐酸性を有する新菌株と認められる。

本発明者らはこの菌株をB. ロンガム M-

8201と命名し、昭和57年5月31日に工業技術院微生物工業技術研究所に寄託し、微工研菌寄第6548号なる受託番号を得た。

(3) ペニシリンGカリウムに対する感受性の比較

本菌、前記寄託株、ATCC15707及びATCC15708の4種のB. ロンガムに属する菌株について、ペニシリンGカリウムに対する感

受性を次の方法により試験した。上記4菌株をブ

リッダスリバーブロース(光岡知足; 臨床検査、18巻、1163~1172頁、1974年)に5%(V/V)接種し、37℃で24時間培養した培養液を被検菌液とした。次にMG寒天培地を用いて調製したペニシリンGカリウムを含む平板に前記被検菌液の1白金耳を画線塗抹し、37℃で常法により嫌気培養した。2~5日培養後、コロニーの形成の有無を観察し、各菌株のペニシリンGカリウムに対する感受性の比較を行なった。ペニシリンGカリウムの培地中の濃度とコロニー形成の有無を第2表に示す。

第 2 表

ペニシリンGカリウムの濃度	本菌	寄託株	ATCC15707	ATCC15708
0 (単位/ml)	+	+	+	+
0.05	+	+	+	+
0.1	+	+	+	-
0.5	+	-	-	-
1.0	(+)	-	-	-

(注) + : コロニーを形成する

(+) : わずかにコロニーを形成する

- : コロニーを全く形成しない

第2表から明らかなように本菌は、他の3菌株よりペニシリンGカリウムに対する感受性が低く0.5~1.0単位/mlの濃度でも発育可能であった。Sutter及びFinogold (Antimicrobial Agents and Chemotherapy、10巻、4号、736~752頁、1976年)はビフィドバクテリウム属のペニシリンGに対する感受性は、

0.5 単位／ mL 以下と報告しており、本菌はビフィ
ドバクテリウム属の中でもペニシリンGカリウム
に対して低い感受性を示す菌株である。

(4) 耐酸性の比較

本菌、前記寄託株、ATCC15707、
ATCC15708の4種のB. ロンガムに属す
る菌株について、耐酸性を次の方法により試験し
た。

4-1) ミルクカルチャーにおける生残性試験

前記ブリツグスリバーブローズを用いて調整し
た前記4菌株の前培養液を酵母エキス0.25%
(W/W)を添加した10% (W/W)還元脱脂乳培
地に10% (V/V)接種して37℃で6~8時間
培養し、さらに同培地で2~4代継代培養し、pH
4.8のミルクカルチャーを調製した。

特開昭58-224685 (11)

このミルクカルチャーを急冷して5℃で保存した
場合の生菌数の変化と生残率を第3表に示す。

ビフィドバクテリウム菌の生菌数は、ミルクカル
チャーを光岡（臨床検査、18巻、1163~
1172頁、1974年）の希釈液で段階的に
希釈した後、MG寒天培地の試験管を用いた高
層寒天培養法（寺口ら；食品衛生学雑誌、23
巻、1号、39~44頁、1982年）で測定
した。

第 3 表

使用したB菌株	項 目	保 存 日 数			
		0	3	5	7
本 菌	生菌数	1.4×10^9	1.4×10^9	1.1×10^9	7.5×10^8
	生残率(%)	100	100	78.6	53.6
寄託株	生菌数	3.0×10^9	1.8×10^9	3.3×10^8	4.5×10^7
	生残率(%)	100	60.0	11.0	1.5
ATCC15707	生菌数	2.8×10^9	9.5×10^7	6.0×10^6	5.9×10^5
	生残率(%)	100	3.4	0.2	0.02
ATCC15708	生菌数	2.1×10^9	3.5×10^8	4.9×10^7	3.0×10^6
	生残率(%)	100	16.7	2.3	0.1

(注) 菌数は1g当り

第3表から明らかなように本菌は他の3菌株よ
りミルクカルチャーにおける生残性が極めて高く
7日間の保存で50%以上の生残率を示した。

4-2) 低pH緩衝液における生残性試験

前記4菌株のミルクカルチャーを滅菌生理食塩
水で1/10に希釈し、これを各pHの緩衝液に
1/30の割合で添加、混合し、最終的に4.0、4.3、
4.6、5.0、6.0の5段階のpHになるように調
整して5℃に保存した。緩衝液はpH 4.0~5.0
の場合1/100モルの酢酸-水酸化ナトリウムの
酢酸緩衝液を使用し、pH 6.0の場合、1/100
モルのリン酸2ナトリウム-リン酸1カリウムの
リン酸緩衝液を使用した。

前記pH緩衝液中の前記4菌株の生菌数の変化と
生残率を第4表に示す。生菌数は前記4-1)項

記載の方法で測定した。

結果を第4表に示す。

第 4 表

pH 使用したB菌株	保 存 日 数									
	0		3		5		7			
	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率	生菌数	生菌率
6.0	本 菌	3.0×10^6	100	2.8×10^6	93.3	1.7×10^6	56.7	1.7×10^6	56.7	56.7
	寄託株	5.6×10^6	100	3.1×10^6	55.4	1.5×10^6	26.8	6.2×10^5	11.1	11.1
	ATCC15707	3.6×10^6	100	1.9×10^6	52.8	8.1×10^5	22.5	1.8×10^5	5.0	5.0
	ATCC15708	4.0×10^6	100	2.2×10^6	55.0	8.8×10^5	22.0	3.8×10^5	9.5	9.5
5.0	本 菌	3.5×10^6	100	2.3×10^6	65.7	1.5×10^6	42.9	8.5×10^5	24.3	24.3
	寄託株	5.2×10^6	100	1.3×10^6	25.0	2.5×10^5	4.8	3.2×10^5	0.6	0.6
	ATCC15707	3.5×10^6	100	1.8×10^6	5.1	2.2×10^5	0.6	1.0×10^5	0.03	0.03
	ATCC15708	2.8×10^6	100	1.5×10^6	5.4	2.4×10^5	0.9	1.9×10^5	0.07	0.07
4.6	本 菌	2.8×10^6	100	1.0×10^6	35.7	5.6×10^5	20	3.3×10^5	11.8	11.8
	寄託株	5.2×10^6	100	1.5×10^6	2.9	1.4×10^5	0.3	1.0×10^5	0.02	0.02
	ATCC15707	3.8×10^6	100	6.7×10^5	1.8	2.2×10^5	0.06	3.6×10^5	0.009	0.009
	ATCC15708	2.5×10^6	100	4.6×10^5	1.8	3.8×10^5	0.2	8.3×10^5	0.03	0.03
4.3	本 菌	2.5×10^6	100	6.8×10^5	27.2	1.6×10^5	6.4	2.9×10^5	12	12
	寄託株	4.8×10^6	100	1.3×10^6	0.3	3.2×10^5	0.007	1.8×10^5	0.0004	0.0004
	ATCC15707	4.5×10^6	100	5.7×10^5	0.1	9.0×10^5	0.002	$< 10^5$	0	0
	ATCC15708	3.5×10^6	100	6.0×10^5	0.2	1.2×10^5	0.003	1.3×10^5	0.0004	0.0004
4.0	本 菌	2.5×10^6	100	3.1×10^5	12.4	5.0×10^4	2.0	7.7×10^4	0.3	0.3
	寄託株	5.5×10^6	100	4.5×10^5	0.8	1.2×10^5	0.002	$< 10^5$	0	0
	ATCC15707	4.8×10^6	100	2.0×10^5	0.004	$< 10^5$	0	$< 10^5$	0	0
	ATCC15708	3.0×10^6	100	3.2×10^5	0.01	2.8×10^5	0.0009	$< 10^5$	0	0

(注) 1) 菌数は1g当り

2) 生菌率: %

第4表から明らかなように、本菌はいずれのpHにおいても他の3菌株より生残性が高く、特にpH 4.0～5.0の低いpH領域においてその差が顕著である。

即ち本菌を5℃で7日間保存した場合、pH 5.0において24.3%、pH 4.6において11.8%、pH 4.3において1.2%、pH 4.0において0.3%の生残率を示すのに対して、他の3菌株はpH 5.0においてさえも生残率がいずれも1%未満である。

本菌の試験結果は、前記 Müllerらの報告と^段比較しても格段にすぐれている。即ち Müllerらの報告ではpH 4.6～4.9で7日間保存したときのビフィドバクテリウム菌の生残率が約1%であるのに対して、本菌のそれはpH 5.0

間発酵し、のち直ちに冷却し、ヨーグルトを製造した。そしてこのヨーグルトを5℃で10日間保持し、ヨーグルト中の本菌の生残菌数を測定した。生菌数の測定は、ヨーグルトを前記光岡の希釈液で段階的に希釈し、ビフィドバクテリウム菌選択培地であるMGLP寒天培地（寺口ら；食品衛生学雑誌、23巻、1号、39～44頁、1982年）を使用した高層寒天培養法によった。

又比較のため本菌の代りにATCC15708を用いて同様に試験した。そして生菌数の変化及び生残率を、ヨーグルトのpH及び乳酸酸度の参考値とともに第5表に示す。

尚、前記寄託株及びATCC15707を用いた試験も行なったが、ATCC15708とはほぼ同等の結果を示したので、これらの菌株の結果は

で24.3、pH 4.6で11.8%である。

このように本菌は低いpH領域においてすぐれた耐酸性を有し、この性質は従来公知の菌株及び文献にも認められないすぐれたものである。

前記の結果と同様の傾向は、前記液体培地ブリッダスリバーブローで培養した各菌株の菌体についても認められた。

4-3) ヨーグルトにおける生残性試験

12% (W/W) の還元脱脂乳を90℃で10分間殺菌した後、45℃に冷却し、10% (W/W) 還元脱脂乳で調整したストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus Thermophilus*) とラクトバチルス・ブルガリクスの混合カルチャー3% (V/V) および本菌のミルクカルチャー2% (V/V) を接種し、40℃で5時

第5表に記載しなかった。

第 5 表

使用した B 菌株	項 目	保 存 日 数			
		直 後	3	7	10
本 菌	pH	4.60	4.60	4.54	4.52
	乳酸酸度(%)	0.88	0.93	0.96	0.98
	B 菌菌数	2.5×10^7	2.0×10^7	1.7×10^7	8.0×10^6
	B 菌生存率(%)	100	80	68	32
ATCC15708	pH	4.62	4.60	4.56	4.55
	乳酸酸度(%)	0.87	0.89	0.95	0.96
	B 菌菌数	3.4×10^7	2.0×10^6	3.0×10^5	3.9×10^4
	B 菌生存率(%)	100	5.9	0.88	0.11

(注) 1) B 菌: ビフィドバクテリウム菌

2) 菌数は 1g 当り

生存率もすぐれていることが試験により確認されているので本菌の用途は極めて広範である。

たとえば、古くから知られている人又は動物の医薬品としての整腸剤に利用できることは勿論、粉末状の食品、飼料あるいは液状又は半固状の飼料、食品に添加あるいは混在させることもできる。

このように本菌は従来公知の菌株には認められないすぐれた性質を有しており、産業上極めて有用である。

実施例 1

肉エキス 50g、酵母エキス 100g、ペプトン 100g、乳糖 200g、 K_2HPO_4 50g、 KH_2PO_4 10g、シスチン 4g 及び水 9.5l からなる培地 (pH 6.5) 10l を $121^\circ C$ で 15 分間滅菌し、 $37^\circ C$ に冷却した。一方、予め

第 5 表から明らかなように本菌を使用して製造したヨーグルトを $5^\circ C$ で 10 日間保存した場合、ヨーグルト中には製造直後の 32% の本菌が生存している。一方 ATCC15708 を使用して製造したヨーグルトでは、1% 以下の生存率であり本菌の生存率が極めて高い。

このように酸性の食品、低 pH 緩衝液及び、ミルクカルチャーにおいて、本菌の生存率と他の B. ロンガムに属する菌のそれとの間には格段の相違が認められ、本菌はすぐれた耐酸性を有することが判明した。

以上のことから本菌は本質的に耐酸性を備えており、培養物又はその加工物の保存中の生菌数の低下が少なく、広い pH 域の飲食物への加工が可能である。更に本菌を凍結及び凍結乾燥したときの

同一組成の培地により $37^\circ C$ で 16 時間前培養した本菌のシードカルチャー 500ml を前記の培地 10l に接種し、 $37^\circ C$ で 16 時間培養した。

さらに $90^\circ C$ で 30 分殺菌した同一組成培地 200l に前記培養液全量 (10.5l) を接種し、 $37^\circ C$ で 16 時間培養した。培養後の生菌数は $2.5 \times 10^9/ml$ であった。

次いでシャープレス型遠心分離機 (15,000 rpm) により菌体を集め、培地と同量の $90^\circ C$ で 30 分間殺菌の生理食塩水に再懸濁し、前記と同様遠心分離して再度集菌した。得られた菌体を脱脂粉乳 10% (W/W)、蔗糖 1% (W/W)、グルタミン酸ソーダ 1% (W/W) からなる溶液 ($90^\circ C$ 、30 分殺菌) 20l に懸濁し、常法に従って凍結乾燥し、 $1.4 \times 10^{11}/g$ の本菌を含

有する粉末約2.2 kgを得た。

実施例2

酵母エキス0.2% (W/W)、脱脂粉乳10% (W/W) からなる90℃30分殺菌後の培地1000 mlに本菌を接種し、37℃で6時間培養した。一方、10% (W/W) 還元脱脂乳培地1500 mlを90℃で30分間殺菌し、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 及びラクトバチルス・ブルガリクス (*Lactobacillus bulgaricus*) の混合カルチャー50 mlを接種し、42℃で4時間培養した。

これとは別に乳脂肪3.1% (W/W)、無脂乳固形分9% (W/W) からなる生乳50 lを60℃に加温し、150 kg/cm²の圧力で均質し、90℃

例1で得た本菌を含有する粉末20 gを加えて均一に混合し、10⁸/gの本菌を含有する粉末の整腸剤約20 kgを得た。

実施例4

トマトピューレ800 g、蔗糖20 g、食塩1 g、グルタミン酸ソーダ0.8 g、香料0.5 g (いずれも市販品) を水160 gと混合し、殺菌冷却し、更にこの混合液に実施例2と同様の方法で調整した本菌20 gと常法により調整したラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) のカルチャー50 gとを添加して均一に混合し、ビフィズス生菌入り乳酸菌飲料約1 kgを製造し、100 ml容ガラスビン10本に分注して密封した。この乳酸菌飲料は製造直後のpHが4.60であり本菌を48×10⁵/ml、ラクトバチルス・カゼイ

で10分間殺菌し、40℃に冷却した。この殺菌

した牛乳に前培養した前記の本菌カルチャー

1000 ml及びストレプトコッカス・サーモフィルスとラクトバチルス・ブルガリクスの混合カルチャー1500 mlを接種し、500 ml容の容器に充てんし、密封し、40℃で4時間培養し、直ちに冷却した。得られた発酵乳は乳酸酸度0.85%、pH 4.40であり、本菌82×10⁶/ml、ストレプトコッカス・サーモフィルス37×10⁷/ml、ラクトバチルス・ブルガリクス31×10⁷/mlを含有していた。この発酵乳を10℃で10日間保存したときの本菌の菌数は21×10⁸/mlであり生残率は26%であった。

実施例3

乾燥殺菌した澱粉14 kg及び乳糖6 kgに、実施

を52×10⁶/ml含有し、10℃で10日間保存したのちの本菌の菌数は59×10⁵/ml、生残率12%であった。

実施例5

市販のコーンミール39 kg、大豆粕21 kg、ホエー粉末10 kg、脱脂粉乳10 kg、ルーサンミール5 kg、蔗糖8 kg、乳糖2 kg、動物脂2 kg、第2リン酸カルシウム1 kg、炭酸カルシウム0.5 kg、飼料用混合無機塩 (オリエンタル酵母工業製) 0.5 kg、飼料用混合ビタミン (オリエンタル酵母工業製) 1 kgからなる子豚用配合飼料100 kgに実施例1で得た本菌を含有する粉末10 gを添加して均一に混合し、子豚育生用の粉末飼料約100 kgを得た。この飼料には1 g当り、製造直後1.4×10⁷の本菌が含まれ、室温で3カ月間保存後では1 g当

特開昭58-224685 (16)

り 3.0×10^5 の本菌が含まれていた。

手 続 補 正 書 (方 式)

昭和57年10月19日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

特許出願人 森永乳業株式会社

代 理 人 弁 理 士 津 田 昭

1 事件の表示

昭和57年特許願第106182号

2 発明の名称

ビフィドバクテリウム・ロンガムに属する新規微生物、その菌体の製造法および該微生物を含む組成物

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

東京都港区芝五丁目33番1号

(612) 森永乳業株式会社

代表者 門 前 賢

4 代 理 人

東京都港区虎ノ門1-11-5 森谷ビル

(8715) 弁理士 津 田 昭

〒105 電 話 03-595-1530

5 補正命令の日付 昭和57年 9 月 9 日

(昭和57年 9 月 28 日発送)

6 補正の対象 明 細 書

7 補正の内容

明細書第1ページ、第20ページないし第23ページ、第38ページ、第41ページ、第44ページおよび第49ページを別紙のとおりに補正します。
(ただし第1ページ以外は内容に変更なし。)

明 細 書

1. 発明の名称

ビフィドバクテリウム・ロンガムに属する新規微生物、その菌体の製造法および該微生物を含む組成物

2. 特許請求の範囲

(1) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して5℃で7日間保持した時、少くとも1%の生存率を有する耐酸性を示すビフィドバクテリウム・ロンガム。

(2) 前記のビフィドバクテリウム・ロンガムが下記の菌学的性質を示すことを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の菌株。

(a) 菌体を滅菌した緩衝液に懸濁し、pHを4.3に調整して5℃で7日間保持した時、少

第 1 表

文 献	(1)			(2)			(3)
	B. ロング var. ロング	B. ロング var. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	
堀および パイオタイプ							B. ロング ライター
46.5°Cに おける生育	-	-	-	-	-	-	
リトマス ミルク凝固	+	+	+	+	+	+	
アラビノース	+	+	+	+	+	+	+
キシロース	+	+	+	+	+	+	+
リボース	+	+	+	+	+	+	+
マンノース	+	+	+	+	+	+	+
フラクトース	+	+	+	+	+	+	+
グルコース							+

(後へ続く)

文 献	(1)			(2)			(3)
	B. ロング var. ロング	B. ロング var. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	
堀および パイオタイプ							B. ロング ライター
ガラクトース							+
シュエークロース	+	+	+	+	+	+	+
マルトース	+	+	+	+	+	+	+
セロビオース	-	-	-	-	-	-	-
ラクトース	+	+	+	+	+	+	+
トレハロース	-	-	-	-	-	-	V
メリビオース	+	+	+	+	+	+	+
ラフィノース	+	+	+	+	+	+	+
メレチトース	+	+	+	+	+	+	+
デキストリン	+	+	+	+	+	+	+
スターチ	+	+	+	+	+	+	V

(後へ続く)

堀および パイオタイプ	B. ロング var. ロング	B. ロング var. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング
	B. ロング var. ロング	B. ロング var. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング
グリコーゲン	-	-	-	-	-	-
イヌリン	-	-	-	-	-	-
マンニトール	-	-	-	-	-	-
ソルビトール	-	-	-	-	-	-
イノシトール	-	-	-	-	-	-
リビトール	-	-	-	-	-	-
ズルシトール	-	-	-	-	-	-
グリセロール	-	-	-	-	-	-
エリスリトール	-	-	-	-	-	-
ラムノース	-	-	-	-	-	-
エスクリン	-	-	-	-	-	-

(後へ続く)

堀および パイオタイプ	B. ロング var. ロング	B. ロング var. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング
	B. ロング var. ロング	B. ロング var. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング	B. ロング ss. ロング
サリシン	-	-	-	-	-	-
アミグダリン	-	-	-	-	-	-
α-メチル グルコシド	+	+	+	+	+	+
α-メチル マンノシド	-	-	-	-	-	-
グルコネート	-	-	-	-	-	-
備 考	グルコースからガス 発生せず。 ソルボース:毒性					同 左 (注1)

第 2 表

ペニシリンGカリウムの濃度	本菌	寄託株	ATCC15707	ATCC15708
0 (単位/ml)	+	+	+	+
0.05	+	+	+	+
0.1	+	+	+	-
0.5	+	-	-	-
1.0	(+)	-	-	-

(注) + : コロニーを形成する
 (+) : わずかにコロニーを形成する
 - : コロニーを全く形成しない

第2表から明らかなように本菌は、他の3菌株よりペニシリンGカリウムに対する感受性が低く0.5~1.0単位/mlの濃度でも発育可能であった。
 Sutter及びFinagold (Antimicrobial Agents and Chemotherapy、10巻4号、736~752頁、1976年) はビフィドバクテリウム属のペニシリンGに対する感受性は、

第 3 表

使用したB菌株	項 目	保 存 日 数			
		0	3	5	7
本 菌	生菌数	1.4×10 ⁸	1.4×10 ⁸	1.1×10 ⁸	7.5×10 ⁸
	生残率(%)	100	100	78.6	53.6
寄託株	生菌数	3.0×10 ⁸	1.8×10 ⁸	3.3×10 ⁸	4.5×10 ⁷
	生残率(%)	100	60.0	11.0	1.5
ATCC15707	生菌数	2.8×10 ⁸	9.5×10 ⁷	6.0×10 ⁷	5.9×10 ⁵
	生残率(%)	100	3.4	0.2	0.02
ATCC15708	生菌数	2.1×10 ⁸	3.5×10 ⁸	4.9×10 ⁷	3.0×10 ⁶
	生残率(%)	100	16.7	2.3	0.1

(注) 菌数は10⁸当り

第 4 表

pH	使用したB菌株	保 存 日 数											
		0		3		5		7		7		7	
		生菌数	生残率	生菌数	生残率	生菌数	生残率	生菌数	生残率	生菌数	生残率	生菌数	生残率
6.0	本 菌	3.0×10 ⁸	100	2.8×10 ⁸	93.3	1.7×10 ⁸	56.7	1.7×10 ⁸	56.7	1.7×10 ⁸	56.7	1.7×10 ⁸	56.7
	寄託株	5.6×10 ⁸	100	3.1×10 ⁸	55.4	1.5×10 ⁸	26.8	6.2×10 ⁸	11.1	6.2×10 ⁸	11.1	6.2×10 ⁸	11.1
	ATCC15707	3.6×10 ⁸	100	1.9×10 ⁸	52.8	8.1×10 ⁸	22.5	1.8×10 ⁸	5.0	1.8×10 ⁸	5.0	1.8×10 ⁸	5.0
	ATCC15708	4.0×10 ⁸	100	2.2×10 ⁸	55.0	8.8×10 ⁸	22.0	3.8×10 ⁸	9.5	3.8×10 ⁸	9.5	3.8×10 ⁸	9.5
5.0	本 菌	3.5×10 ⁸	100	2.3×10 ⁸	65.7	1.5×10 ⁸	42.9	8.5×10 ⁸	24.3	8.5×10 ⁸	24.3	8.5×10 ⁸	24.3
	寄託株	5.2×10 ⁸	100	1.3×10 ⁸	25.0	2.5×10 ⁸	4.8	3.2×10 ⁸	0.6	3.2×10 ⁸	0.6	3.2×10 ⁸	0.6
	ATCC15707	3.5×10 ⁸	100	1.8×10 ⁸	5.1	2.2×10 ⁸	0.6	1.0×10 ⁸	0.03	1.0×10 ⁸	0.03	1.0×10 ⁸	0.03
	ATCC15708	2.8×10 ⁸	100	1.5×10 ⁸	5.4	2.4×10 ⁸	0.9	1.9×10 ⁸	0.07	1.9×10 ⁸	0.07	1.9×10 ⁸	0.07
4.6	本 菌	2.8×10 ⁸	100	1.0×10 ⁸	35.7	5.6×10 ⁸	2.0	3.3×10 ⁸	11.8	3.3×10 ⁸	11.8	3.3×10 ⁸	11.8
	寄託株	5.2×10 ⁸	100	1.5×10 ⁸	2.9	1.4×10 ⁸	0.3	1.0×10 ⁸	0.02	1.0×10 ⁸	0.02	1.0×10 ⁸	0.02
	ATCC15707	3.8×10 ⁸	100	6.7×10 ⁸	1.8	2.2×10 ⁸	0.06	3.6×10 ⁸	0.009	3.6×10 ⁸	0.009	3.6×10 ⁸	0.009
	ATCC15708	2.5×10 ⁸	100	4.6×10 ⁸	1.8	3.8×10 ⁸	0.2	8.3×10 ⁸	0.03	8.3×10 ⁸	0.03	8.3×10 ⁸	0.03
4.3	本 菌	2.5×10 ⁸	100	6.8×10 ⁸	27.2	1.6×10 ⁸	6.4	2.9×10 ⁸	1.2	2.9×10 ⁸	1.2	2.9×10 ⁸	1.2
	寄託株	4.8×10 ⁸	100	1.3×10 ⁸	0.3	3.2×10 ⁸	0.007	1.8×10 ⁸	0.0004	1.8×10 ⁸	0.0004	1.8×10 ⁸	0.0004
	ATCC15707	4.5×10 ⁸	100	5.7×10 ⁸	0.1	9.0×10 ⁸	0.002	<10 ⁸	0	<10 ⁸	0	<10 ⁸	0
	ATCC15708	3.5×10 ⁸	100	6.0×10 ⁸	0.2	1.2×10 ⁸	0.003	1.3×10 ⁸	0.0004	1.3×10 ⁸	0.0004	1.3×10 ⁸	0.0004
4.0	本 菌	2.5×10 ⁸	100	3.1×10 ⁸	12.4	5.0×10 ⁸	2.0	7.7×10 ⁸	0.3	7.7×10 ⁸	0.3	7.7×10 ⁸	0.3
	寄託株	5.5×10 ⁸	100	4.5×10 ⁸	0.08	1.2×10 ⁸	0.002	<10 ⁸	0	<10 ⁸	0	<10 ⁸	0
	ATCC15707	4.8×10 ⁸	100	2.0×10 ⁸	0.004	<10 ⁸	0	<10 ⁸	0	<10 ⁸	0	<10 ⁸	0
	ATCC15708	3.0×10 ⁸	100	3.2×10 ⁸	0.01	2.8×10 ⁸	0.0009	<10 ⁸	0	<10 ⁸	0	<10 ⁸	0

(注) 1) 菌数は10⁸当り
 2) 生残率: %

第 5 表

使用した B 菌 株	項 目	保 存 日 数			
		直 後	3	7	10
本 菌	pH	4.60	4.60	4.54	4.52
	乳酸酸度(%)	0.88	0.93	0.96	0.98
	B 菌菌数	2.5×10^7	2.0×10^7	1.7×10^7	8.0×10^6
	B 菌生存率(%)	100	80	68	32
ATCC15708	pH	4.62	4.60	4.56	4.55
	乳酸酸度(%)	0.87	0.89	0.95	0.96
	B 菌菌数	3.4×10^7	2.0×10^6	3.0×10^6	3.9×10^4
	B 菌生存率(%)	100	5.9	0.88	0.11

(注) 1) B 菌: ビフィドバクテリウム菌
 2) 菌数は 1 g 当り